

В.В. ЗИНЧУК, Е.С. БИЛЕЦКАЯ, И.Э. ГУЛЯЙ

ЭФФЕКТ ОЗОНА НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС КРОВИ В ОПЫТАХ *IN VITRO*

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Изучен эффект озона на прооксидантно-антиоксидантный баланс крови экспериментальных животных в опытах *in vitro*. Инкубация крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия (концентрации 2, 6, 10 мг/л) в течение 30 и 60 минут обуславливает изменение в состоянии прооксидантной системы крови, проявляющееся в увеличении уровня малонового диальдегида, диеновых конъюгатов, а также в активации антиоксидантной системы, что подтверждается ростом активности каталазы, концентрации ретинола и α -токоферола.

Ключевые слова: озон, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, каталаза, ретинол, α -токоферол.

Введение. Озонотерапия является активно развивающимся направлением как клинической, так и профилактической медицины, которая относится к группе методов окислительной терапии, в неё входят как достаточно широко используемые (гипербарическая оксигенация, ультрафиолетовое облучение крови, лазерное излучение низкой интенсивности и т.д.), так и новые методы, в частности, использование доноров оксида азота, синглетно-кислородная терапия [17, 21, 23].

Обладая высокой реактогенной способностью, озон активно вступает в реакции с различными биологическими объектами, в том числе с мембранными структурами клетки, которые выступают в роли основной мишени его физиологического действия [16]. При введении даже очень низких доз озона наблюдается активация метаболизма, сопровождающаяся повышением содержания в крови свободного и растворенного кислорода [3]. На основании проведенных экспериментов выяснено, что использование озонированной эритроцитарной массы при ее трансфузии крысам стимулирует антиоксидантную систему в клетках в ответ на усиление активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [24]. Однако до сих пор не изучены механизмы действия озона в организме при различных состояниях, в частности, на генерацию свободных радикалов, образующихся при озонировании изотонического раствора 0,9% NaCl [15]. По этой причине особый интерес представляют эффекты озона, которые он оказывает на прооксидантно-антиоксидантный баланс организма [12].

Целью данного исследования являлось изучение эффекта озона на прооксидантно-антиоксидантный баланс крови экспериментальных животных в опытах *in vitro*.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 20 белых крысах-самцах массой 250-300г., содержащихся в стандартных условиях вивария. При использовании адекватного наркоза (50мг/кг тиопентала натрия интраперитонеально) проводили забор смешанной крови из правого предсердия. Изъятие крови осуществляли в предварительно подготовленный шприц с количеством гепарина из расчета 50 ЕД на 1 мл крови. Все манипуляции на животных выполнялись в соответствии с рекомендациями и решением региональной комиссии по биомедицинской этике.

Объектом исследования явилась кровь, которую разделили на четыре группы, по десять проб в каждой: первая контрольная – вводили 0,9%-й раствор хлорида натрия. В кровь остальных вводили данный раствор с концентрацией O_3 2 мг/л (вторая группа), 6 мг/л (третья группа), 10 мг/л (четвертая группа). Время инкубации составило 30 и 60 минут. Изотонический раствор 0,9% NaCl барботировали озono-кислородной смесью при помощи озонотерапевтической установки УОТА-60-01-Медозон (Россия).

Далее кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут для разделения плазмы и эритроцитов, которые затем дважды промывали охлажденным изотоническим раствором хлорида натрия. Для получения гемолизата к 0,2 мл эритроцитарной массы добавляли 1 мл дистиллированной

воды и оставляли при комнатной температуре. В эритроцитарной массе определяли показатели ПОЛ и антиоксидантной системы.

Активность свободнорадикальных процессов оценивали по содержанию первичных (диеновые конъюгаты (ДК)) и промежуточных (малоновый диальдегид (МДА)) продуктов ПОЛ. Уровень ДК в эритроцитарной массе определяли по интенсивности поглощения липидным экстрактом монохроматического светового потока в области спектра 232–234 нм, характерного для конъюгированных диеновых структур гидроперекисей липидов [4]. Оптическую плотность измеряли на спектрофлуориметре СМ 2203 «Солар» (Беларусь) при длине волны 233 нм по отношению к контролю. Концентрацию ДК выражали в виде $\Delta D_{233}/\text{мл}$. Содержание МДА оценивали по взаимодействию с 2'-тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре в кислой среде приводит к образованию триметинового комплекса розового цвета [11], а интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре РV1251С «Солар» (Беларусь) при длине волны 540 нм, по отношению к контролю. Концентрацию МДА выражали в мкмоль/л.

Активность каталазы оценивали по способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс при длине волны 410 нм на спектрофотометре РV1251С «Солар» (Беларусь) [11]. Концентрацию α -токоферола и ретинола определяли по методу S.L. Taylor [25], основанному на определении интенсивности флуоресценции гексанового экстракта при длине волны возбуждения 286 нм и испускания 350 нм (для α -токоферола) и при длине волны возбуждения 325 нм и испускания 470 нм (для ретинола) на спектрофлуориметре СМ 2203 «Солар» (Беларусь). В контрольную пробу вместо исследуемого материала вносили аликвоту бидистиллированной воды, а в стандартную – рабочего раствора, приготовленного из стандартов α -токоферола и ретинола («Sigma»). Концентрацию α -токоферола и ретинола выражали в мкмоль/л.

Все показатели проверяли на соответствие признака закону нормального распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом этого использовали непараметрическую статистику с применением программы “Statistica 10.0”. Сравнение трех и более независимых групп проводили с помощью рангового дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Достоверность полученных данных, с учетом размеров малой выборки, множественных сравнений, оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. При проведении парных сравнений уровней показателей внутри групп при повторных измерениях, использовали критерий Вилкоксона. Результаты представлены как медиана (Ме) [25-й; 75-й квартильный размах]. Уровень статистической значимости принимали за $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Характер изменения ПОЛ представлен на рисунке 1. Содержание МДА в эритроцитарной массе (рис. 1А) увеличивается с 4,08 [3,41; 5,78] до 12,49 [12,09; 14,20] ($p < 0,05$), до 16,96 [13,82; 18,42] ($p < 0,05$), до 17,43 [13,93; 20,11] ($p < 0,05$) мкмоль/л при концентрации озона 2, 6, 10 мг/л, соответственно. Подобная тенденция наблюдается и в отношении уровня ДК в эритроцитарной массе (рис. 1Б), которые возрастали с 18,21 [16,77; 18,29] до 19,07 [17,8; 20,71] ($p < 0,05$), до 22,84 [21,99; 24,21] ($p < 0,05$), до 22,64 [21,05; 25,55] ($p < 0,05$) ЕД/мл при концентрации озона 2, 6, 10 мг/л, соответственно.

Показатели антиоксидантной защиты представлены в таблице. Активность каталазы возрастает, наиболее значимо на 22,8% ($p < 0,05$) и на 29,8% ($p < 0,05$) в группах с концентрацией озона 6 и 10 мг/л соответственно. Содержание α -токоферола по сравнению с контролем увеличилось на 31,27% ($p < 0,05$), на 67,04% ($p < 0,05$) и на 53,44% ($p < 0,05$) в группах с концентрацией озона 2, 6, 10 мг/л соответственно. Также отмечается рост уровня ретинола (на 18,8% ($p < 0,05$) при концентрации озона 2 мг/л).

Физиологическая активность озона в организме – результат изменения свободно-радикального статуса в ответ на поступление активных кислородных и озоновых метаболитов от внешнего источника [2]. Известно, что добавление озонированного изотонического раствора хлорида натрия 0,4 мл с концентрацией O_3 400, 800, 1200 мкг/л к крови беременных с угрожающим выкидышем вызывает рост как первичных, так и конечных продуктов ПОЛ (уровень ДК в крови в 2,4 раза выше, чем у здоровых беременных) [7].

При действии озono-кислородной смеси с концентрацией озона 10–100 мкг/л на кровь собак установлено, что минимальные концентрации озона (10 и 20 мкг/л) не вызывают сдвига липопероксидации относительно исходного равновесного состояния, а при более высоких дозах озона (начиная с концентрации 50 мкг/л) интенсивность образования конечных продуктов ПОЛ нарастает [14].

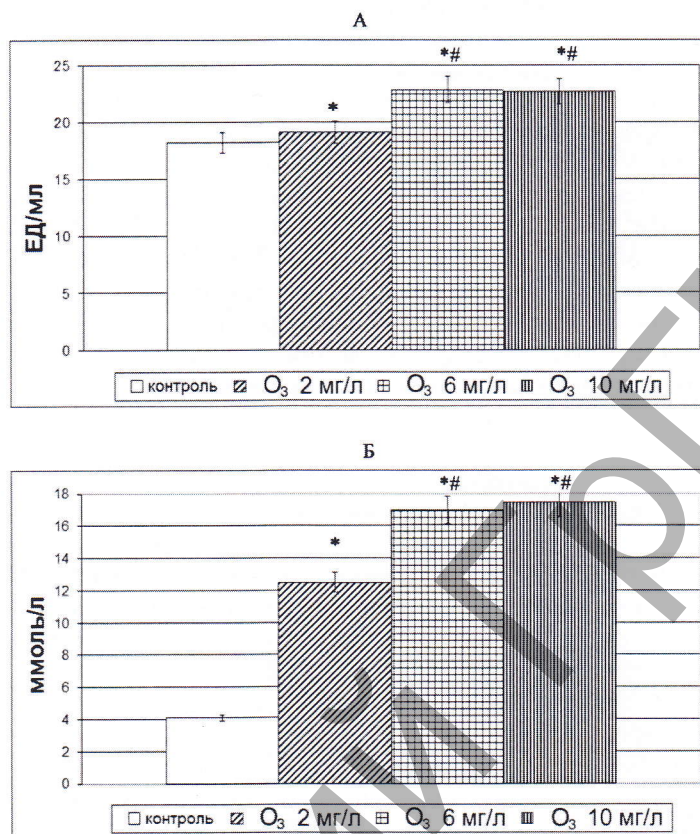


Рис. 1. Уровень диеновых конъюгатов (А) и малонового диальдегида (Б) в эритроцитарной массе при инкубации крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия. Примечание – достоверные изменения в сравнении с контролем (*); с группой 2 мг/л O₃ (#).

При введении крысам после кровопотери отмытых эритроцитов (0,5 мл) и озонированного изотонического раствора 0,9% NaCl (2 мл с концентрацией озона 2 мг/л) происходит увеличение содержания МДА на 15% по сравнению с контролем, в тканях и органах наблюдается повышение активности таких антиоксидантных ферментов, как супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [8].

Табл. Эффект озона на показатели антиоксидантной защиты крови при экспозиции 60 минут (Ме [25; 75])

Показатель	Контроль	O ₃ 2 мг/л	O ₃ 6 мг/л	O ₃ 10 мг/л
n	10	10	10	10
Каталаза, ммоль H ₂ O ₂ /мин/г Нб	16,30 [15,37;16,50]	18,15 [17,95;18,67]*	20,02 [18,77;21,34]*#	21,15 [20,73;21,43]*#
α-токоферол, мкмоль/л	8,89 [7,35; 10,44]	11,67 [9,55; 13,18]*	14,85 [12,65;16,41]*#	13,61 [12,91;14,20]*#
Ретинол, мкмоль/л	0,8 [0,7; 0,87]	0,95 [0,82; 1,01]*	1,04 [0,97; 1,09]*#	1,05 [0,98; 1,11]*#

Примечание – достоверные изменения в сравнении с контролем (*); с группой 2 мг/л O₃ (#).

Известна способность озона активировать процессы ПОЛ в ходе окисления биологических субстратов, что по механизму обратной связи стимулирует механизмы антиоксидантной защиты организма [10]. Отмечающиеся нарушения динамического равновесия при воздействии высоких концентраций озона, вызывают развитие оксидативного стресса, тогда как при низких концентрациях это не приводит к росту образования свободных радикалов [1,5]. В ответ на введение первых доз озона наблюдается некоторое увеличении свободнорадикальных процессов, а при дальнейшем добавлении данного газа в тканях и органах происходит повышение, прежде всего, активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, что

свидетельствует об активизации антиоксидантной системы организма [20]. Предполагается, что оптимизация про- и антиоксидантных систем, на фоне введения озона, происходит за счет повышения активности антиоксидантных ферментов [13,18], как это наблюдалось в проведенных опытах. Кроме того, он воздействует на кислородзависимые процессы организма: способен стимулировать энергетический обмен путём оптимизации утилизации кислорода, повышать энергетическую эффективность тканевых окислительных процессов [19], а также при его применении отмечается интенсификация активности ферментов, катализирующих аэробные процессы окисления углеводов, липидов и белков с образованием энергетического субстрата АТФ [16]. Можно предположить, что в выявленном эффекте озона участвует и сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо, способствующий улучшению потока кислорода в ткани, а в условиях окислительного стресса, когда нарушена утилизация кислорода тканями, влияет на активность процессов свободнорадикального окисления [6, 9].

Заключение. Таким образом, инкубация крови с озонированным изотоническим раствором хлорида натрия в диапазоне концентраций от 2 до 10 мг/л обуславливает изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса крови, проявляющееся увеличением уровня ДК, МДА в эритроцитарной массе, а также ростом активности каталазы, концентраций ретинола и α -токоферола. Выраженность данного эффекта наиболее значима при концентрациях озона 6 и 10 мг/л.

Литература:

- [1]. Алехина С.П., Щербатюк Т.Г. Озонотерапия: клинические и экспериментальные аспекты. Н. Новгород: Литера, 2003. 240 с.
- [2]. Ансатаров Ж.Э., Любинский В.Л. Влияние озона на динамику реологических показателей крови // Реаниматология и интенсивная терапия. Анестезиология. 2000. № 4. С. 19-20.
- [3]. Волховская Н.Б., Колесова О.Е. Экспериментальные исследования воздействия озонированного физиологического раствора на состояние окислительно- восстановительного равновесия // Символ науки. 2015. № 10. С. 217-221.
- [4]. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. спектрофотометрическое содержание гидроперекисей липидов в плазме // Лабораторное дело. 1983. № 3. С. 33-36.
- [5]. Гвозденко Т.А., Кытикова О.Ю., Иванов Е.М. Биоокислительные технологии в пульмонологии // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2011. № 41. С. 79-81.
- [6]. Глуткина Н.В., Зинчук В.В. Кривая диссоциации оксигемоглобина : физиологическое значение // Новости медико-биологических наук. 2009. № 4. С. 90-98.
- [7]. Гречканев Г.О., Конторщикова К.Н., Качалина Т.С. Экспериментальное обоснование озонотерапии акушерских осложнений // Нижегородский медицинский журнал. 2002. № 1. С. 20-25.
- [8]. Дерюгина А.В., Галкина Я.В., Симутис И.С. и др. Экспериментальное обоснование использования озона в трансфузионной терапии кровопотери у крыс // Известия Уфимского научного центра РАН. 2017. № 1. С. 41-45.
- [9]. Зинчук В.В. Роль кислородсвязывающих свойств крови и газотрансмиттеров в развитии оксидативных повреждений и гипоксических состояний // Новости медико-биологических наук. 2016. Т. 14. № 4. С. 55-63.
- [10]. Исхакова Р.Р., Сайфуллина Ф.Р. Изменение органа зрения при алкоголизме // Казанский медицинский журнал. 2013. Т. 94. С. 101-105.
- [11]. Камышиников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Мн.: Беларусь, 2002. 2-е изд.Т. 1.465 с.
- [12]. Масленников О.В., Конторщикова К.Н., Шахов Б.Е. Руководство по озонотерапии. Н. Новгород: Исток, 2015. 4-е изд.346 с.
- [13]. Павлова О.Е.//Человек, здоровье, физическая культура и спорт в изменяющемся мире: Материалы VI научно-практической конференции. Коломна, 1996. С. 154-155.
- [14]. Перетягин С.П., Конторщикова К.Н., Мартусевич А.А. Влияние использования активных форм кислорода на состояние микроциркуляции при моделировании комбинированной термической травмы в эксперименте // Медицинский альманах. 2012. Т. 21. С. 101-104.
- [15]. Северина А.С., Шестакова М.В. Нарушение системы гемостаза у больных сахарным диабетом // Сахарный диабет. 2007. № 3. С. 66-68.
- [16]. Шаназарова Н.А., Лисовская Н.Ю., Лисовский Е.В. и др. Возможности метода озонотерапии в реабилитации онкологических пациентов (обзор литературы) // Медицинские науки. 2016. Т. 94. С. 113-119.
- [17]. Щербатюк Т.Г. Современное состояние озонотерапии в медицине. Перспективы применения в онкологии // Современные технологии в медицине. 2010. № 1. С. 99-106.
- [18]. Barone A., Otero-Losada M., Grangeat A.M.et. al. Effects of oxygen ozone therapy on cardiac function in a patient with a prior myocardial infarction // Int.J. Cardiol. 2016. Vol. 223. P. 258-261.
- [19]. Bocci V., Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments // Front. Chem. 2015. Vol. 3. P. 4.

- [20]. Borrelli E., De Monte A., Bocci V. Oxygen ozone therapy in the integrated treatment of chronic ulcer: a case series report // Int. J. Recent Scien. Research. 2015. Vol. 6. P. 4132-4136.
- [21]. Clavo B., Santana-Rodriguez N., Llontop P. et al. // Evid.-Bas. Compl. Alt. Med. 2015. Vol. 2015. P. 480369.
- [22]. Gogebashvili J. // Infert. Europ. J. of Med. 2015. Vol. 7, No. 1. P. 1-18.
- [23]. Onal O., Yetisir F., Sarer A.E. et. al. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility // Mediat. Inflamm. 2015. Vol. 2015. P. 792016.
- [24]. Orakdogan M., Uslu S., Emon S.T. et. al. Ozone Partially Decreases Axonal and Myelin Damage in an Experimental Sciatic Nerve Injury Model // Turk. Neurosurg. 2016. Vol. 26. P. 860-865.
- [25]. Taylor S.L., Lamden M.P., Tappel A.L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis // Lipids. 1976. Vol. 11. P. 530-538.

Поступила в редакцию: 24.04.2018 г.

V.V. ZINCHUK, E.S. BILITSKAYA, I.E. GULAI

EFFECT OF OZONE ON THE PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN THE BLOOD *IN VITRO* STUDIES

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Summary

The action of ozone on the prooxidant-antioxidant balance in the blood of animals was studied *in vitro*. Incubation of blood with the solutions of ozone in 0.9% NaCl (doses of ozone 2, 6, and 10 mg/l) for 30 and 60 minutes changes the state of the blood prooxidant system, followed by increase in the levels of malonic dialdehyde and diene conjugates. At the same time the activation of antioxidant system in the blood was observed, that is confirmed by increase in the activity of catalase, and the levels of retinol and α -tocopherol.

Key words: ozone, malonic dialdehyde, diene conjugates, catalase, retinol, α -tocopherol.